

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の 細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid on Bacteria

要約

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用い、用量設定試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株についてそれぞれ156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群のTA100, TA98およびTA1537ならびにS9 mix添加群のTA100で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた。

以上の結果より、本試験条件下では2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸は、変異原性を有する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537¹⁾ ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB.N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。平成8年11月13日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸ニカリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース

(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加え、30 mLをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバツフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で6時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol
精製水	残量

5. 被験物質

被験物質の2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸(ロット番号:96001)は分子式C₇H₇NO₅S, 分子量217.20, 純度79.60%(不純物として水分;15.90%, NaSO₄;1.75%, NaCl;0.01%, 硫酸分;2.74%を含む)の液体である。日本化薬(株)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

注射用蒸留水に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。ただし、本被験物質の純度は95%未満であるため純度換算を行った。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

従って、本試験においてはS9 mix無添加群ならびに添加群の各試験菌株について5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

またTA1535を用いた確認試験では、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量とし、5用量(公差1000)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF-2:和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム(NaN_3 :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(ACR:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるブレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μL 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500 μL 添加し、さらに試験菌液100 μL を加え、37℃で20分間振盪培養(ブレインキュベーション)した。培養終了後、トッパアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

また陽性結果を示した菌株については、当該用量における誘発コロニー数(当該用量のコロニー数/溶媒対照でのコロニー数)を試験用量(mg/plate)で除すことにより

比変異活性(比活性)を算出した。

結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれにおいても、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸処理による生育阻害作用は観察されなかった。また、S9 mix無添加群のTA100、TA98およびTA1537ならびにS9 mix添加群のTA100で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた。2回繰り返して実施した試験においてTA1535での復帰突然変異コロニー数が溶媒対照の1.5~2倍程度を示したが、明確に陽性と判定できなかった。再現性を確認するためS9 mix無添加群ならびに添加群のTA1535株について確認試験を実施した結果、明確な復帰突然変異誘発作用は観察されなかった(Table 5~6)。変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性は42.1を示した。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、試験中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下において、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陽性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3(1976).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 益森勝志, 板倉真由実

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜

582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Shoji Masumori, Mayumi Itakura

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid (1st trial)
[direct method:-S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	110	112	114	19	19	17	30	28	28	21	27	26	7	7	6
		[112 \pm 2]			[18 \pm 1]			[29 \pm 1]			[26 \pm 1]			[7 \pm 1]		
	156	108	108	114	18	13	21	36	26	30	30	30	39	4	6	6
		[110 \pm 3]			[17 \pm 4]			[31 \pm 5]			[33 \pm 5]			[5 \pm 1]		
	313	107	101	106	15	17	14	28	27	30	40	46	46	5	5	5
		[105 \pm 3]			[15 \pm 2]			[28 \pm 2]			[44 \pm 3]			[5 \pm 0]		
	625	107	115	111	15	16	15	35	30	30	55	53	49	6	6	5
	[111 \pm 4]			[15 \pm 1]			[32 \pm 3]			[52 \pm 3]			[6 \pm 1]			
1250	119	134	131	12	10	15	25	36	34	52	54	62	9	11	8	
	[128 \pm 8]			[12 \pm 3]			[32 \pm 6]			[56 \pm 5]			[9 \pm 2]			
2500	140	146	164	24	22	18	28	29	30	84	109	104	15	13	16	
	[150 \pm 12]			[21 \pm 3]			[29 \pm 1]			[99 \pm 13]			[15 \pm 2]			
5000	206	195	210	24	22	21	34	33	41	147	139	149	30	36	28	
	[204 \pm 8]			[22 \pm 2]			[36 \pm 4]			[145 \pm 5]			[31 \pm 4]			
Positive control		573	598	599 ^{a)}	403	413	363 ^{b)}	155	180	190 ^{a)}	456	451	457 ^{c)}	534	530	537 ^{d)}
		[590 \pm 15]			[393 \pm 26]			[175 \pm 18]			[455 \pm 3]			[534 \pm 4]		

a) :AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) :NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
c) :AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) :ACR; 9-Aminoacridine hydrchloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid (1st trial)
[activation method:+S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	109	120	113	16	14	12	35	35	27	32	30	34	14	10	13
		[114 \pm 6]			[14 \pm 2]			[32 \pm 5]			[32 \pm 2]			[12 \pm 2]		
	156	113	119	111	21	18	22	27	26	27	27	28	25	7	8	8
		[114 \pm 4]			[20 \pm 2]			[27 \pm 1]			[27 \pm 2]			[8 \pm 1]		
	313	109	130	109	16	20	20	30	27	28	26	30	33	15	13	11
		[116 \pm 12]			[19 \pm 2]			[28 \pm 2]			[30 \pm 4]			[13 \pm 2]		
	625	115	119	117	18	14	12	35	28	33	33	31	31	14	9	10
	[117 \pm 2]			[15 \pm 3]			[32 \pm 4]			[32 \pm 1]			[11 \pm 3]			
1250	112	133	139	11	13	14	32	32	29	29	31	34	11	10	12	
	[128 \pm 14]			[13 \pm 2]			[31 \pm 2]			[31 \pm 3]			[11 \pm 1]			
2500	158	162	162	19	22	17	30	35	31	36	33	38	17	18	16	
	[161 \pm 2]			[19 \pm 3]			[32 \pm 3]			[36 \pm 3]			[17 \pm 1]			
5000	260	249	254	29	25	28	32	41	29	46	53	46	17	19	14	
	[254 \pm 6]			[27 \pm 2]			[34 \pm 6]			[48 \pm 4]			[17 \pm 3]			
Positive control		732	739	728 ^{a)}	387	396	375 ^{b)}	411	432	396 ^{c)}	382	365	351 ^{d)}	171	143	163 ^{b)}
		[733 \pm 6]			[386 \pm 11]			[413 \pm 18]			[366 \pm 16]			[159 \pm 14]		

a) :2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) :2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) :2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) :2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid (2nd trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	123	130	133	18	20	23	22	30	28	24	26	28	8	8	7
		[129 \pm 5]			[20 \pm 3]			[27 \pm 4]			[26 \pm 2]			[8 \pm 1]		
	156	119	126	131	23	23	18	25	25	25	30	35	32	5	7	5
		[125 \pm 6]			[21 \pm 3]			[25 \pm 0]			[32 \pm 3]			[6 \pm 1]		
	313	117	122	123	23	22	17	29	28	24	28	26	30	5	5	5
		[121 \pm 3]			[21 \pm 3]			[27 \pm 3]			[28 \pm 2]			[5 \pm 0]		
	625	122	120	136	26	23	21	35	26	35	44	41	47	5	5	6
	[126 \pm 9]			[23 \pm 3]			[32 \pm 5]			[44 \pm 3]			[5 \pm 1]			
1250	136	152	152	25	27	32	24	24	29	45	51	53	8	9	11	
	[147 \pm 9]			[28 \pm 4]			[26 \pm 3]			[50 \pm 4]			[9 \pm 2]			
2500	185	185	179	25	25	22	31	31	30	82	90	98	16	14	13	
	[183 \pm 3]			[24 \pm 2]			[31 \pm 1]			[90 \pm 8]			[14 \pm 2]			
5000	285	285	284	36	40	48	34	29	30	130	134	130	28	33	35	
	[285 \pm 1]			[41 \pm 6]			[31 \pm 3]			[131 \pm 2]			[32 \pm 4]			
Positive control		537	536	555 ^{a)}	471	487	407 ^{b)}	198	176	190 ^{a)}	454	496	460 ^{c)}	533	577	559 ^{d)}
		[543 \pm 11]			[455 \pm 42]			[188 \pm 11]			[470 \pm 23]			[556 \pm 22]		

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 c) : AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : ACR; 9-Aminoacridine hydrchloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid (2nd trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	125	125	131	16	14	17	27	34	34	35	26	27	11	12	8
		[127 \pm 3]			[16 \pm 2]			[32 \pm 4]			[29 \pm 5]			[10 \pm 2]		
	156	134	134	130	19	17	16	33	30	31	26	24	30	15	11	8
		[133 \pm 2]			[17 \pm 2]			[31 \pm 2]			[27 \pm 3]			[11 \pm 4]		
	313	136	114	128	18	23	14	29	36	35	28	28	30	10	11	12
		[126 \pm 11]			[18 \pm 5]			[33 \pm 4]			[29 \pm 1]			[11 \pm 1]		
	625	146	123	134	17	22	15	29	30	39	29	24	27	9	12	8
	[134 \pm 12]			[18 \pm 4]			[33 \pm 6]			[27 \pm 3]			[10 \pm 2]			
1250	159	146	137	21	22	18	30	28	34	25	26	36	8	9	8	
	[147 \pm 11]			[20 \pm 2]			[31 \pm 3]			[29 \pm 6]			[8 \pm 1]			
2500	164	172	185	19	21	19	28	28	33	30	31	31	15	16	17	
	[174 \pm 11]			[20 \pm 1]			[30 \pm 3]			[31 \pm 1]			[16 \pm 1]			
5000	295	311	283	26	26	26	36	26	31	34	39	41	13	16	17	
	[296 \pm 14]			[26 \pm 0]			[31 \pm 5]			[38 \pm 4]			[15 \pm 2]			
Positive control		711	692	693 ^{a)}	383	352	393 ^{b)}	469	468	459 ^{c)}	366	358	392 ^{d)}	163	171	149 ^{b)}
		[699 \pm 11]			[376 \pm 21]			[465 \pm 6]			[372 \pm 18]			[161 \pm 11]		

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 5. Results of the confirmative examination of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [direct method:-S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Test sub.	0		17 20 21 [19 \pm 2]			
	1000		20 22 29 [24 \pm 5]			
	2000		16 18 20 [18 \pm 2]			
	3000		18 19 20 [19 \pm 1]			
	4000		17 16 20 [18 \pm 2]			
	5000		19 22 19 [20 \pm 2]			
Positive control			480 442 435 ^{b)} [452 \pm 24]			

b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 6. Results of the confirmative examination of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [activation method:+S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Test sub.	0		15 19 20 [18 \pm 3]			
	1000		17 17 16 [17 \pm 1]			
	2000		13 12 13 [13 \pm 1]			
	3000		15 17 16 [16 \pm 1]			
	4000		25 20 21 [22 \pm 3]			
	5000		19 22 18 [20 \pm 2]			
Positive control			361 298 354 ^{b)} [338 \pm 35]			

b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の チャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸が培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、連続処理法ならびに短時間処理法で2200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10 mM相当) を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度および低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理 (18時間の回復時間) 後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

その結果、連続処理ならびに短時間処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸は、染色体異常を誘発しない (陰性) と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL) を選択した。昭和59年11月15日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド (DMSO: MERCK社) を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数5の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地 (LIFE TECHNOLOGIES社) に、メンブランフィルター (0.45 μm : CORNING社) を用いて加圧濾過除菌した非働化 (56°C, 30分) 済み仔牛血清 (LIFE TECHNOLOGIES社) を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷蔵所 (4°C) に保存した。

3. 培養条件

CO₂ インキュベーター (FORMA社あるいは三洋電機特機(株)) を用い、CO₂ 濃度5%, 37°Cの条件で細胞を培

養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った¹⁾。

5. 被験物質

被験物質の2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸 (ロット番号: 96001) は分子式C₇H₇NO₅S, 分子量217.20, 純度79.60% (不純物として水分; 15.90%, NaSO₄; 1.75%, NaCl; 0.01%, 硫酸分; 2.74%を含む) の液体である。日本化薬(株) から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

生理食塩液 (株) 大塚製薬工場) に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った (用時調製)。ただし、本被験物質の純度は95%未満であるため純度換算を行った。

7. 予備試験 (細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。連続処理の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理ではS9 mix非存在下 (-S9 mix) あるいは存在下 (+S9 mix) で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業(株)) で固定した後、0.1%クリスタルバイオレット (関東化学(株)) 水溶液で10分間染色した。色素溶出液 (30%エタノール, 1%酢酸水溶液) を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、いずれの処理法においても明確な細胞増殖抑制は観察されなかった (Fig. 1)。

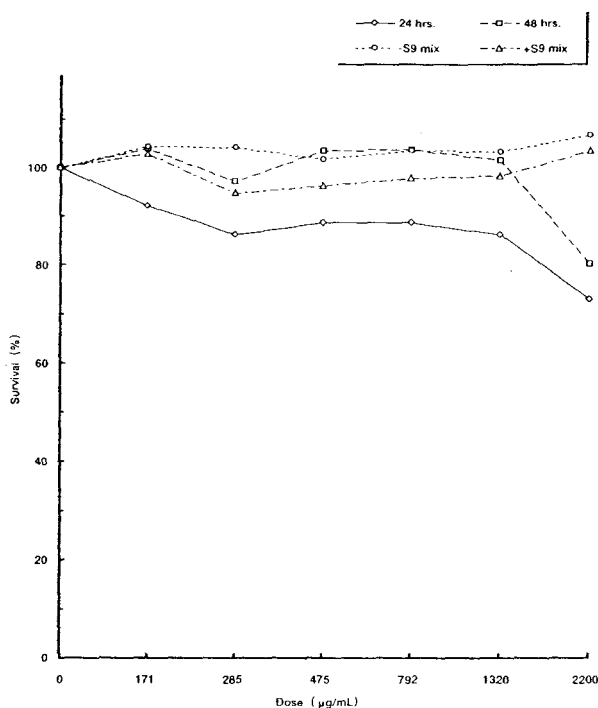


Fig. 1 Dose-survival curves of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても2200 µg/mL (10 mM相当)を最高処理濃度とし、以下公比2で減じた計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理の場合、マイトマイシンC (MMC:協和醗酵工業株)を、24時間処理で0.05 µg/mL、48時間処理で0.025 µg/mLの用量で、短時間処理の場合、シクロホスファミド (CP:塩野義製薬株)を、12.5 µg/mLの用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 µg/mLとなるようコルセミド (LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液 (メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量あたり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色分体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色分体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学

会・哺乳動物試験分科会²⁾による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合 (+gap) と、含まない場合 (-gap) とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸処理群の場合、いずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、S9 mix非存在下および存在下のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。なお、連続処理および短時間処理の各試験系において、全ての試験用量で培養液のpHの低下が認められたが、培養液交換時あるいは培養終了時には中性域に戻っていた。以上の試験結果から、本試験条件下において2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸のチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, 66, 277 (1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 31-35.
- 3) 石館基 監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 19-24.

Table 1 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [continuous exposure]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				SA	Pol
Test sub.	0	24	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	1.0	-	-
	550	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-	-
	1100	24	200	3	0	0	1	0	0	2.0	0.5	1.5	-	-
	2200	24	200	3	0	1	2	0	0	3.0	1.5	1.0	-	-
MMC*	0.05	24	200	23	39	2	74	1	0	50.5	47.5	0.5	+	-
Test sub.	0	48	200	1	0	0	0	1	0	1.0	0.5	0.0	-	-
	550	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.0	-	-
	1100	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-	-
	2200	48	200	1	2	0	1	0	0	2.0	1.5	1.0	-	-
MMC*	0.025	48	200	13	34	0	68	1	0	46.0	43.0	0.5	+	-

*: Positive control (mitomycin C)

ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others
SA: Structural aberration Pol: polyploid cell

Table 2 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [short-term exposure]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				SA	Pol
Test sub.	0	-	6	200	1	1	0	1	0	0	1.0	1.0	0.5	-	-
	550	-	6	200	1	0	1	1	0	0	1.5	1.0	0.0	-	-
	1100	-	6	200	1	2	0	0	0	0	1.5	1.0	0.5	-	-
	2200	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.0	-	-
CP*	12.5	-	6	200	1	1	0	0	0	0	1.0	0.5	0.0	-	-
Test sub.	0	+	6	200	1	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-	-
	550	+	6	200	0	2	0	3	0	0	2.0	2.0	1.5	-	-
	1100	+	6	200	1	0	1	2	0	0	2.0	1.5	0.0	-	-
	2200	+	6	200	2	0	0	2	0	0	2.0	1.0	0.0	-	-
CP*	12.5	+	6	200	18	43	2	145	1	0	79.0	78.0	0.0	+	-

*: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others
SA: Structural aberration Pol: polyploid cell

連絡先

試験責任者：中嶋 圓
試験担当者：益森勝志，板倉真由実
財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
Shoji Masumori, Mayumi Itakura
Biosafety Research Center/Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

